

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 05309000
PUBLICATION DATE : 22-11-93

APPLICATION DATE : 13-05-92
APPLICATION NUMBER : 04146178

APPLICANT : IATRON LAB INC;

INVENTOR : KITA HIROSHI;

INT.CL. : C12Q 1/68 C12N 15/11 C12N 15/38 C12Q 1/70

TITLE : METHOD FOR DETECTING EPSTEIN-BARR VIRUS

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain a method for rapidly and accurately detecting Epstein-Barr virus.

CONSTITUTION: A mixture solution containing at least one of 4 combinations of the first DNA primer containing an oligonucleotide part of specific ≥ 15 bases with the second DNA primer, a DNA polymerase and an aqueous liquid test sample is subjected to a DNA amplifying step and the resultant reactional solution is then subjected to a DNA inspecting step. Furthermore, at least one of four probes, containing an oligonucleotide part of specific ≥ 10 bases and carrying a label is brought into contact with a test sample to detect a signal from the label.

COPYRIGHT: (C) JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-309000

(43) 公開日 平成5年(1993)11月22日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	8114-4B		
C 1 2 N 15/11				
15/38				
C 1 2 Q 1/70		8114-4B		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/00	A
			審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 11 頁)	

(21) 出願番号 特願平4-146178

(22) 出願日 平成4年(1992)5月13日

(71) 出願人 000138277

株式会社ヤトロン

東京都千代田区東神田1丁目11番4号

(72) 発明者 平井 莞二

神奈川県秦野市鶴巻666-1 M101

(72) 発明者 弘中 孝史

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

(72) 発明者 喜多 寛

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

(74) 代理人 弁理士 森田 憲一

(54) 【発明の名称】 エプスタイン-バーウイルスの検出方法

(57) 【要約】

【目的】 迅速かつ正確なエプスタイン-バーウイルスの検出方法の提供。

【構成】 特定の15塩基以上のオリゴヌクレオチド部分を含有する第1のプライマーと第2のプライマーとの4種の組合せの少なくとも1種とDNAポリメラーゼと水性液体被検試料とを含む混合液をDNA増幅工程にかけ、続いて得られた反応液をDNA検査工程にかける。又は、特定の10塩基以上のオリゴヌクレオチド部分を含有し、標識を担持する4種のプローブの少なくとも1種と被検試料とを接触させ、前記標識からの信号を検出する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列表における配列番号1の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第1のDNAプライマーと配列表における配列番号2の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第2のDNAプライマーとの組合せ、(b) 配列表における配列番号3の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第1のDNAプライマーと配列表における配列番号4の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第2のDNAプライマーとの組合せ、(c) 配列表における配列番号5の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第1のDNAプライマーと配列表における配列番号6の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第2のDNAプライマーとの組合せ、及び(d) 配列表における配列番号7の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第1のDNAプライマーと配列表における配列番号8の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第2のDNAプライマーとの組合せからなる群から選んだ、第1のプライマーと第2のプライマーとの組合せ少なくとも1種とDNAポリメラーゼと水性液体被検試料とを含む混合液をDNA増幅工程にかけ、続いて得られた反応液をDNA検査工程にかけ、検出方法。

【請求項2】 配列表における配列番号9、配列番号10、配列番号11又は配列番号12の配列で表される塩基配列の少なくとも10塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有し、標識を担持するプローブと被検試料とを接触させ、前記標識からの信号を検出することと特徴とする、エプスタイン-バーウイルスの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、エプスタイン-バーウイルス (Epstein-Barr Virus; 以下、EBVと称することがある) の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 エプスタイン-バーウイルス (EBV) はヘルペス科に属するウイルスの一種で、成人の大多数がこれに感染しており、ほぼ全員が抗体陽性である。多くの人が生後3歳までに感染するが、不顕性感染が多いので特に病状は現れない。しかし、宿主の免疫機能が低下した場合にはEBVが再活性化されることがある。特に、悪性腫瘍患者やAIDS患者、更に骨髄移植を受けた者などにEBVの再活性化が見られ、その病状として伝染性単核症の発病や予後の悪化等があり、致

命的な場合もある。従って、上咽頭癌、パーキットリンパ腫又は日和見リンパ腫などのEBV感染症を確定的に診断することは臨床的に極めて重要である。

【0003】 従来から、EBVの検出方法としては、生体液 (血液、唾液等) や組織又は細胞からEBVを分離して同定する方法や、血清中のウィルスカプシド抗原 (VCA) 又は核内抗原 (EBNA) 等を測定する免疫学的な検査法が使われている。しかし、ウィルスを分離する診断では結果を得るまでに時間がかかり、免疫学的な方法では抗体非特異反応が起きたり、高感度が得られないという問題があるほか、抗体価が変化するためにウィルスの消長を追跡することが難しいという欠点があった。従って、臓器移植や骨髄移植などの場合だけでなく、疾病の診断に関して、短時間で正確にEBVの診断を可能にする手法及び体外診断薬の開発が望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者は、迅速かつ正確にEBVを検出するために、EBVのDNA又はRNAに特異的な各種の塩基配列を検索し、その配列に相補的なDNA断片を合成して、EBVのプライマーやプローブとしての評価を行ったところ、EBVのDNA又はRNAと特異的にハイブリダイズするプライマーやプローブとして用いることができるものを見出した。本発明はかかる知見に基づくものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 従って、本発明は、(a) 配列表における配列番号1の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第1のDNAプライマー (以下、第1プライマー (1a) と称することがある) と配列表における配列番号2の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第2のDNAプライマー (以下、第2プライマー (2a) と称することがある) との組合せ、(b) 配列表における配列番号3の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第1のDNAプライマー (以下、第1プライマー (1b) と称することがある) と配列表における配列番号4の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第2のDNAプライマー (以下、第2プライマー (2b) と称することがある) との組合せ、(c) 配列表における配列番号5の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第1のDNAプライマー (以下、第1プライマー (1c) と称することがある) と配列表における配列番号6の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第2のDNAプライマー (以下、第2プライマー (2c) と称することがある) との組合せ、及び

(d) 配列表における配列番号7の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第1のDNAプライマー〔以下、第1プライマー(1d)と称することがある〕と配列表における配列番号8の配列で表される塩基配列の少なくとも15塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有する第2のDNAプライマー〔以下、第2プライマー(2d)と称することがある〕との組合せからなる群から選んだ、第1のプライマーと第2のプライマーとの組合せ少なくとも1種とDNAポリメラーゼと水性液体被検試料とを含む混合液をDNA増幅工程にかけ、続いて得られた反応液をDNA検査工程にかけることを特徴とする、エプスタイン-バールウイルスの検出方法に関する。更に、本発明は、配列表における配列番号9、配列番号10、配列番号11又は配列番号12の配列で表される塩基配列の少なくとも10塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有し、標識を担持するプローブと被検試料とを接触させ、前記標識からの信号を検出することを特徴とする、エプスタイン-バールウイルスの検出方法にも関する。本明細書の塩基配列に於いて、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、そして、Tはチミンの意味である。

【0006】本発明方法で用いる検体は、EBVを含有している疑いのある試料であれば特に限定されない。例えば、唾液、血液又は組織からの抽出物を用いることができる。

【0007】プライマーの組合せを用いる本発明のEBV検出方法は、主に、(1)DNA増幅工程と、(2)DNA検出工程とからなる。本発明のEBV検出方法においては、最初にDNA増幅工程を行うのが好ましい。

【0008】本発明のDNA増幅工程(1)では、PCR(Polymerase chain reaction)法を用いることができる。PCR法を利用すると、微量のDNAから、目的とするDNA領域のみを自動的に約100万倍にまで増幅できる(Science, 239:487-491, 1988)。PCR法では、増幅させるDNA領域を挟んで+鎖に対するプライマー(以下、第1プライマーと称する)及び-鎖に対するプライマー(以下、第2プライマーと称する)の2種のDNAプライマーを用いる。

【0009】本発明のDNA増幅工程(1)で用いる第1プライマーと第2プライマーとの組合せとしては、

- (a) 第1プライマー(1a)と第2プライマー(2a)
- (b) 第1プライマー(1b)と第2プライマー(2b)
- (c) 第1プライマー(1c)と第2プライマー(2c)
- (d) 第1プライマー(1d)と第2プライマー(2d)

の4種の組合せがあり、これらの組合せのいずれか1種を単独で用いるか、又は2種以上を同時に用いることができる。

【0010】本発明による前記の各プライマーの組合せ(a)又は(b)を用いると、EBVの全DNA配列の中で、BamHI W領域(リピート領域)のみのDNA領域を特異的に増幅できる。ここで、プライマーの組合せ(a)で増幅する領域をBamHI W-1と称し、そして、プライマーの組合せ(b)で増幅する領域をBamHI W-2と称する。具体的にはBamHI W-1に相当する195bp部分、又は、BamHI W-2に相当する134bp部分が、それぞれ特異的に大量に増幅される。また、プライマーの組合せ(c)を用いると、EBVの全DNA配列の中で、EBER1領域のみのDNA領域を特異的に増幅できる。ここで、プライマーの組合せ(c)で増幅する領域をEBERと称する。具体的にはEBERに相当する157bp部分が、特異的に大量に増幅される。最後に、プライマーの組合せ(d)を用いると、EBVの全DNA配列の中で、LMP領域(latent membrane protein)のみのDNA領域を特異的に増幅できる。ここで、プライマーの組合せ(d)で増幅する領域をLMPと称する。具体的にはLMPに相当する318bp部分が、特異的に大量に増幅される。

【0011】前記の各第1プライマー及び各第2プライマーはそれぞれ15mer~30merであることができるが、一般的には20mer~25merであるのが好ましい。15mer未満であると塩基配列の特異性が低下し、また、30merを越えると特異性は上がるが合成コストが高くなる。本発明方法で用いる第1プライマー及び第2プライマーをそれぞれ構成する各塩基は、公知の任意の態様で修飾(例えばビオチン化又は発光物質によるラベル化)されていてもよい。本発明による前記のそれぞれの第1プライマー及び第2プライマーは、通常のDNA自動合成機(例えばアプライドバイオシステム社製)を用いて、公知のDNA合成法(例えばホスファミダイド法)によって調製することができる。

【0012】本発明のDNA増幅工程(1)では、第1プライマー及び第2プライマーとともに、DNAポリメラーゼ、特に耐熱性ポリメラーゼを用いて増幅サイクルを繰り返す。耐熱性DNAポリメラーゼとしては、特に95℃までの温度で活性を維持することができるDNAポリメラーゼ、例えば、市販のTaqポリメラーゼを用いることができる。

【0013】本発明のDNA増幅工程では、前記の第1プライマーと第2プライマーとの特定のプライマーの組み合わせ、DNAポリメラーゼ及び液体被検試料を含む混合液を用いる。第1プライマー、第2プライマー及びDNAポリメラーゼの使用量は、液体被検試料の種類によって変化するが、PCR法によるDNA増幅工程を実

施することができる範囲で容易に決定することができる。この混合液は場合により、緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液）、安定化剤（例えば、ゼラチン）、又は塩類（例えば、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム）を含有することができる。

【0014】本発明方法では、前記の混合液を用いてPCR法の増幅サイクルを実施する。増幅サイクルは、

(i) DNAの変性工程（約90℃～95℃、約10秒～2分間）、(ii) 1本鎖DNAと第1プライマー及び第2プライマーとのアニーリング工程（約37℃～70℃、約30秒～3分間）、及び (iii) DNAポリメラーゼによるDNA合成工程（約65℃～80℃、約30秒～5分間）とからなる。

【0015】1サイクル毎にDNA量は2倍に増幅され、nサイクル後には2ⁿ倍に増幅される。本発明においては、増幅サイクル数を10～60回、好ましくは20～40回繰り返す。最後のサイクルにおいては、工程(ii)の条件で加熱時間を約5～10分間延長してDNA合成が完全に行われるようにするのが好ましい。被検試料中にEBV-DNAが存在する場合には、前記の増幅工程で増幅サイクル終了後に、約50～500bpのDNAが大量に合成される。このDNAを次のDNA検査工程によって検出する。

【0016】DNA検査工程としては、ゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を利用する方法、電気泳動後にフィルターに移してサザンブロットハイブリッド法を行う方法、増幅したDNAをそのままフィルターにブロットしてドットブロットハイブリッド法を行う方法、又は、ジデオキシ法による塩基配列決定法などを用いることができる。ゲル電気泳動法を行う場合には、例えば、アガロースゲルを担体としたサブマリン型電気泳動、又はアクリルアミドを用いたスラブ型電気泳動を使用することができる。

【0017】サザンブロットハイブリッド法、ドットブロットハイブリッド法、又は、*insitu*ハイブリッド法を行う場合には、非放射性プローブ（例えば、酵素標識プローブ、ビオチン化プローブ、ジゴキシン化プローブ、又は、化学発光物質、蛍光物質で標識したプローブ）を用いることができる。

【0018】更に、ジデオキシ法による塩基配列決定法を利用する場合には、蛍光ラベルを使用したDNAオートシーケンサー（例えば、アプライドバイオシステムズ社）を用いることができる。

【0019】前記第1プライマー及び第2プライマーの各種組合せを用いる本発明方法においては、被検試料中にEBV-DNAが存在する場合のみ、前記の組合せに応じて、それぞれBamHI W領域の一部分、EBFR1領域の一部分、及び、LMP領域の一部分に相当する塩基配列部分が短時間のうちに特異的に大量に増幅合成される。従って、被検試料中におけるEBV-DNA

の存在をきわめて特異的に検出することができる。更に、被検試料中のEBV-DNA量が微量であってもDNAが増幅合成されるので高感度である。

【0020】本発明は、更に、EBV-DNAの特異的な検出に用いることのできる4種類のDNAプローブを提供するものでもある。これらのDNAプローブは、

(A) 配列表における配列番号9の配列で表される塩基配列の少なくとも10塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有するプローブ（以下、プローブAと称することがある）、(B) 配列表における配列番号10の配列で表される塩基配列の少なくとも10塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有するプローブ（以下、プローブBと称することがある）、(C) 配列表における配列番号11の配列で表される塩基配列の少なくとも10塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有するプローブ（以下、プローブCと称することがある）、(D) 配列表における配列番号12の配列で表される塩基配列の少なくとも10塩基からなるオリゴヌクレオチド部分を含有するプローブ（以下、プローブDと称することがある）である。これらのプローブを単独あるいは同時に用いることができる。

【0021】前記プローブAは、BamHI W領域（リピート領域）のDNA領域に特異的であり、プローブAの長さは被検試料に対する前処理の種類によって異なる。被検試料が前記組合せ(a)の第1プライマー(1a)と第2プライマー(2a)とを用いるPCR法によるDNA増幅工程を経たものである場合には、10bpからPCR法で増幅されるDNA断片の大きさまでであることができる。また、被検試料がPCR法のDNA増幅工程を経たものでなく、プローブAを*insitu*ハイブリッド法に用いる場合には、プローブAの長さは10bpからBamHI W領域（約3kbp）の大きさまで可能である。配列表における配列番号9の配列で表される40塩基のDNAプローブ(40mer)は、被検試料がPCR法によるDNA増幅工程を経たものであっても、あるいは、*insitu*ハイブリッド法の場合であっても、いずれにも用いることができるので好ましい。

【0022】前記プローブBは、BamHI W領域（リピート領域）のDNA領域に特異的であり、プローブBの長さは被検試料に対する前処理の種類によって異なる。被検試料が前記組合せ(b)の第1プライマー(1b)と第2プライマー(2b)とを用いるPCR法によるDNA増幅工程を経たものである場合には、10bpからPCR法で増幅されるDNA断片の大きさまでであることができる。また、被検試料がPCR法のDNA増幅工程を経たものでなく、プローブBを*insitu*ハイブリッド法に用いる場合には、プローブBの長さは10bpからBamHI W領域（約3kbp）の大きさまで可能である。配列表における配列番号10の配

列で表される40塩基のDNAプローブ(40mer)は、被検試料がPCR法によるDNA増幅工程を経たものであっても、あるいは、*in situ*ハイブリッド法の場合であっても、いずれにも用いることができるので好ましい。

【0023】前記プローブCは、EBER1領域のDNA領域に特異的であり、プローブCの長さは被検試料に対する前処理の種類によって異なる。被検試料が前記組合せ(c)の第1プライマー(1c)と第2プライマー(2c)とを用いるPCR法によるDNA増幅工程を経たものである場合には、10bpからPCR法で増幅されるDNA断片の大きさまでであることができる。また、被検試料がPCR法のDNA増幅工程を経たものでなく、プローブCを*in situ*ハイブリッド法に用いる場合には、プローブCの長さは10bpからEBER1領域(173bp)の大きさまで可能である。配列表における配列番号11の配列で表される40塩基のDNAプローブ(40mer)は、被検試料がPCR法によるDNA増幅工程を経たものであっても、あるいは、*in situ*ハイブリッド法の場合であっても、い

ずれにも用いることができるので好ましい。

【0024】前記のプローブDは、LMP(latent membrane protein)をコードする遺伝子領域のDNA領域に特異的であり、プローブDの長さは被検試料に対する前処理の種類によって異なる。被検試料が前記組合せ(d)の第1プライマー(1d)と第2プライマー(2d)とを用いるPCR法によるDNA増幅工程を経たものである場合には、10bpからPCR法で増幅されるDNA断片の大きさまでであることができる。また、被検試料がPCR法のDNA増幅工程を経たものでなく、プローブDを*in situ*ハイブリッド法に用いる場合には、プローブDの長さは10bpからLMP領域(約2kbp)の大きさまで可能である。配列表における配列番号12の配列で表される40塩基のDNAプローブ(40mer)は、被検試料がPCR法によるDNA増幅工程を経たものであっても、あるいは、*in situ*ハイブリッド法の場合であっても、い

ずれにも用いることができるので好ましい。

【0025】プローブA、B、C、及び、Dの調製法としては、サクシノイミド(例えば、ジサクシミジルスベレイト)を用いる方法、マレイミド法、活性ハロゲン(active halogen)法、アジド化合物での光反応、あるいは、カルボジイミド法を挙げることができる。プローブA、B、C、及び、Dの標識物質としては、従来公知の任意の物質を使用することができる。好ましくは、非放射性物質(例えば、酵素、ビオチン、ジギキシゲニン、化学発光物質、又は、蛍光物質等)を用いる。

【0026】標識化DNAの合成方法には、大別すると、(1)DNA合成過程で直接的に標識化DNAを調

製する方法と、(2)リンカーを結合させたDNAを合成してから、これを単離し、標識試薬を作用させる方法とがあり、特に方法(2)は目的に応じて標識物質を容易に変更でき、応用面で優れているので好ましい。方法(2)で用いるリンカーとしては、5'-ジメトキシトリエチル-5-(N-(トリフルオロアセチルアミノヘキシル)-3-アクリルイミド)-2'-デオキシウリジン-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]ホスホルアミダイト等を挙げることができる。プローブに結合されている標識物質から信号を発生させ、更にその信号を測定する方法も、従来から公知の任意の方法を用いることができる。

【0027】前記のプローブを用いる本発明方法においては、(場合によりPCR法で増幅した)EBV-DNAに特異的な標識DNAプローブを用いるので、極めて正確にEBV-DNAを検出することができる。

【0028】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1：プライマーの合成

381A型自動DNA合成装置(アプライドバイオシステムズ社)に、アデニンCPGカラムを装着して配列表の配列番号1、配列番号3、配列番号5及び配列番号6の各配列に記載の塩基25個のプライマー(1a')、(1b')、(1c')及び(2c')と、配列表の配列番号7の配列に記載の塩基23個のプライマー(1d')と、配列表の配列番号8の配列に記載の塩基22個のプライマー(2d')を合成し、グアニンCPGカラムを装着して配列表の配列番号2の配列に記載の塩基25個のプライマー(2a')を合成し、そしてシトシンCPGカラムを装着して配列表の配列番号4の配列に記載の塩基25個のプライマー(2b')をそれぞれ合成した。アンモニア水(約30%)2.5mlを入れたディスポシリンジ(2.5ml)を、合成が完了したCPGカラムに接続し、アンモニア水をカラム内に押し出して、合成したDNAフラグメントを溶出した。回収したDNAアンモニア溶液の入ったバイアル瓶を密栓し、65℃で6時間加熱した後、室温まで冷やしてから濃縮した。濃縮物を完全に乾燥し、10mMトリエチレンアンモニウムアセテート(pH7.4)(以下、TEA-Aと称す)に溶解した。一方、予めNennsorbTMPrep(NEN Research Products Biotechnology Systems)カラムを10mlのメタノールで洗浄して、次に5mlのTEA-Aを入れ、カラムを平衡化した。このカラムに前記のプライマー溶液を通して、10%アセトニトリルを含むTEA-A(10ml)でカラムを洗浄した後、このカラムに0.5%トリフルオロ酢酸25mlを通した。更に、TEA-A(10ml)でカラムを洗浄した後、カラムに吸着

しているプライマーを3.5%メタノール5mlで溶出した。溶出したプライマー溶液を減圧下で乾燥して、保存し、後記の実施例3等で用いた。

【0029】実施例2：酵素標識プローブの調製

4種のDNAプローブ合成を前記実施例1と同様の装置を用いて、同様の条件で行ったが、但し、配列表の配列番号9の配列に記載の塩基40個のプローブA'の合成ではアデニンCPGカラムを用いて5'末端から30番目のTを、配列表の配列番号10の配列に記載の塩基40個のプローブB'はアデニンCPGカラムを用いて5'末端から15番目のTを、配列表の配列番号11の配列に記載の塩基40個のプローブC'はシトシンCPGカラムを用いて5'末端から10番目のTを、そして配列表の配列番号12の配列に記載の塩基40個のプローブD'はグアニンCPGカラムを用いて5'末端から20番目のTをそれぞれ5'-ジメトキシトリエチル-5-[N-(トリフルオロアセチルアミノヘキシル)-3-アクリリミド]-2'-デオキシウリジン-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)ホスホルアミダイト(グレインリサーチ社)(以下、リンカーと称す)に置き換えた。尚、リンカーの位置はこの部位に限らず、他のチミン部位に置き換えることも可能である。リンカー付きプローブの精製も実施例1に記載した条件で行った。

【0030】精製したリンカー付きプローブ3nmolを8μlの滅菌水に溶解した。この溶液に0.2M-NaHCO₃/4mM-EDTA溶液8μlを加えた後、ジサクシニミジルスベライト(Pierce社)(以下、DSSと称す)のジメチルスルホキシド溶液(10mg/ml)50μlを加え、室温で暗所にて15分間反応させた。反応終了後、反応液に滅菌水30μlを加えて遠心し、上清をHPLC(東ソーG3000PWカラム;移動相=水)にかけ、DSSと結合したDNA(以下、修飾リンカーDNAと称す)を分取し、凍結乾燥した。乾燥した修飾リンカーDNAにアルカリホスファターゼ(ペーリンガーマンハイム社のEIA用試薬を2倍に濃縮して調製した試薬:20mg/ml;以下、APと称す)40μlを加え、室温で暗所にて16時間反応させた。反応終了後、0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.4)で未反応のAPを除き、0.33M-NaClを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.4)で目的のAP標識DNAを溶出した。分取した精製AP標識DNAの溶出液(約6ml)を3M-NaClを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.4)に対して透析した後、1mlに濃縮した。この濃縮物をAP標識プローブとして後記の実施例5等で用いた。

【0031】実施例3：PCR法によるEBV-DNAの増幅及び検出感度

精製したEBV-DNA[EBV感染細胞株(東京医科大学難治疾患研究所保存;No. MDH0601)

から採取したDNAを精製した)の希釈液(5pg~0.00005pg)を調製して試料とした。試料5μlに、GeneAmp DNA Amplificationキット(宝酒造)の10×PCR用緩衝液5μl、dNTP混合液8μl、20倍希釈したTaqポリメラーゼ(AmpliTaq DNAポリメラーゼ、シータス社)溶液5μl、前記実施例1で調製したプライマーを各0.4μMを加え、滅菌水で全量を50μlに調製した後、DNAサーマルサイクラー(Perkin Elmer Cetus社)を用いて、1サイクルが(1)94℃で1分間、(2)60℃で2分間、及び(3)72℃で3分間の処理工程を30サイクル行い、最後に72℃で7分間の処理を行うプログラムでDNAの増幅を行った。

【0032】実施例4：電気泳動による増幅DNAの確認

電気泳動用のゲルは、トリス塩基5.4g、硼酸2.7g、及び0.5M-EDTA2mlを含む緩衝液(pH8.0)(以下、0.5×TBEと称す)1リットルにアガロース1.8%又は0.7%を溶解し、ミュニビッド(アドバンス社)のゲルプレートに流して調製した。次に、実施例3においてPCR反応の終了した溶液10μlに、0.25%プロモフェノールブルー及び15%フィコール(ファルマシア社)の溶液2μlを混合し、その混合溶液全量をサンプルウェルに入れた。0.5×TBEを電極槽に入れて、室温で100Vにて、45分間電気泳動した。電気泳動終了後、アガロースをエチジウムブロマイドで染色し、UVイルミネーター照射下で電気泳動の結果を観察したところ、195bp、134bp、157bp及び318bpにバンドを確認することができた。結果を図1に示す。図1のBamHI-1[上段]は前記第1プライマー(1a')と第2プライマー(2a')とを用いた場合、BamHI-2[上段]は前記第1プライマー(1b')と第2プライマー(2b')とを用いた場合、EBER[上段]は前記第1プライマー(1c')と第2プライマー(2c')とを用いた場合、そしてLMP[上段]は前記第1プライマー(1d')と第2プライマー(2d')とを用いた場合にそれぞれ相当する。エチジウムブロマイド染色では、プライマー(1a')とプライマー(2a')、及びプライマー(1b')とプライマー(2b')との組み合わせでは0.005pgまで検出でき、プライマー(1c')とプライマー(2c')、及びプライマー(1d')とプライマー(2d')との組み合わせでは0.05pgまで検出できた。

【0033】実施例5：サザンブロットハイブリッド法による増幅DNAの確認

前記実施例4で電気泳動を確認した後、1M-NaClを含む0.5N-NaOH溶液500mlにアガロースゲルを30分間浸漬させ、次に、1.5M-NaClを含

む0.5Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)500mlにアガロースゲルを移して30分間中和した。中和したアガロースゲルを20×SSCで濡らした濾紙(ワットマン社)(濾紙の両端を20×SSCに漬けておく)の上に置き、そのアガロースゲルの上に滅菌水で濡らしたナイロンフィルター(Hybond-N⁺、アマーシャム社)を載せ、更に、キムタオル(十條キンバリー社)を約5cmの高さに載せて、約500gの負荷をかけて室温で16時間放置して、DNAをアガロースゲルからフィルターにプロットした。フィルターを減圧下で1時間乾燥させた後、80℃で1時間ベーキングした。次に、サルコシン0.1%、SDS0.5%、核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング剤(ペーリンガーマンハイム社)5%、及びホルムアミド30%を含む5×SSC(以下、ハイブリダイゼーション用緩衝液と称す)中で前記のフィルターを37℃で1時間放置した後、実施例2で調製したAP標識プローブ(3pモル)を加えたハイブリダイゼーション用緩衝液5mlに前記のフィルターを移し、37℃で一晩反応させた。AP標識プローブとのハイブリダイゼーション処理が済んだフィルターを2×SSC100mlで室温で5分間の洗浄を3回行い、次に、0.1%SDSを含む2×SSC100ml中で42℃で45分間静置した。更に、2×SSC100ml中で室温で5分間の洗浄を3回行った。最後に、0.1M-NaCl、10mM-MgCl₂を含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH9.5)(以下、発色液と称す)に30秒間~1分間フィルターを浸漬して馴染ませた。

【0034】ニトロブルーテトラゾリウム(ペーリンガーマンハイム社)75mgを30%滅菌水70%ジメチルホルムアミド混合液1mlに溶解した溶液(以下、NB-T溶液と称する)を調製した。また、5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(ペーリンガーマンハイム社)50mgをジメチルホルムアミド混合液1mlに溶解した溶液(以下、BCIP溶液と称する)を調製した。前記発色液に馴染ませたフィルターの入ったプラスチックバッグに、NB-T溶液40μl、及びBCIP40μlを加えた発色液10mlを入れ、37℃で5分間~5時間静置して発色させた。APの反応は、10mM-EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)50mlにフィルターを浸漬することで停止させた。この結果、195bpのバンドにはプローブA'がハイブリダイズし、そして134bpのバンドにはプローブB'が、157bpのバンドにはプローブC'が、更に318bpのバンドにはプローブD'がそれぞれハイブリダイズしたことを確認することができた。結果を図1に示す。図1のBamHI-1〔下段〕はプローブA'、BamHI-2〔下段〕はプローブB'、EBER〔下段〕はプローブC'、そしてLMP〔下段〕はプローブD'をそれぞれ用いた場合に相当する。サザンブロットハイブリッド法では、プライマー(1a')とプライマー(2

a')、及びプライマー(1b')とプライマー(2b')との組み合わせで増幅させたDNAを、それぞれプローブA'、及びプローブB'で反応させた場合は0.0005pgまで検出でき、プライマー(1c')とプライマー(2c')、及びプライマー(1d')とプライマー(2d')との組み合わせで増幅させたDNAを、それぞれプローブC'、及びプローブD'で反応させた場合は0.005pgまで検出できた。

【0035】実施例6：EBV及びその他のウイルスに対するプライマーの特異性

本発明によるEBV増幅用プライマーの特異性を調べた。ウイルスとしては、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV: Towne株)、単純ヘルペスウイルス-I型(HSV-I: HF株)、単純ヘルペスウイルス-II型(HSV-II: UW268株)、パリスローゾスターウイルス(VZV: 帯状性泡しん分離株: H-N3株)、エプスタイン-バルウイルス(EBV: B95-8株)、及びHHV-6(突発性発疹分離株)を用い、実施例3記載の条件でPCR法によるDNA増幅を行い、交差反応の有無を調べた。結果を図2に示す。図2のBamHI-1は前記第1プライマー(1a)と第2プライマー(2a)とを用いた場合、BamHI-2は前記第1プライマー(1b)と第2プライマー(2b)とを用いた場合、EBERは前記第1プライマー(1c)と第2プライマー(2c)とを用いた場合、そしてLMPは前記第1プライマー(1d)と第2プライマー(2d)とを用いた場合にそれぞれ相当する。EBV-DNAのみに各プライマーで増幅された特異的なDNAバンドが検出され、EBV以外のウイルスDNAとは交差反応をしないことが示された。

【0036】実施例7：EBV非感染細胞株及びEBV分離株を用いたプライマーの特異性

EBV非感染細胞株及びEBV分離株を用いてプライマーの特異性を調べた。EBV非感染細胞としては、BJAB株(東京医科歯科大学難治疾患研究所保存No. MDH0101)及びMolt4株(東京医科歯科大学難治疾患研究所保存No. MDH0200)を、また、EBV感染細胞としては、Raji株(東京医科歯科大学難治疾患研究所保存No. MDH0301)、P3HR-1株(東京医科歯科大学難治疾患研究所保存No. MDH0401)、B95-8株(東京医科歯科大学難治疾患研究所保存No. MDH0601)及びAKATA株(東京医科歯科大学難治疾患研究所保存No. MDH0501)を用い、実施例3記載の条件でPCR法によるDNA増幅を行い、ヒトリンパ球のDNAとの交差反応の有無、及びウイルス感染細胞中のEBV-DNAを検出できるかどうかを調べた。結果を図3に示す。図3のBamHI-1、BamHI-2、EBER、及びLMPは前記図2と同じ意味である。EBV非感染細胞であるBJAB及びMolt4細胞株のDNAでは特異的

反応によるDNAバンドは検出されなかった。また、EBV感染細胞では、全てのプライマーの組合せで特異的なDNAバンドが検出され、これら本発明によるプライマーは、EBV-DNAがよく保存されている領域に設定されていることが示された。

【0037】実施例8：EBV感染患者由来試料中のEBV-DNAの検出

以下の被検試料を調製した。即ち、EBVを含有する伝染性単核症患者から採取した血液中の単核球画分（ 1×10^6 個）に滅菌水1mlを加えて試料とした。試料5μlを用いて実施例3～5と同様に操作を行った結果、エチジウムブロマイド染色によると、195bp、134bp、157bp及び318bpにバンドを観察することができた。更に、サザンブロットハイブリッド法によると、195bpにはプローブA'が、134bpにはプローブB'が、157bpにはプローブC'が、318bpにはプローブD'が、それぞれハイブリダイズしたことを確認することができた。

【0038】実施例9：AP標識プローブによるEBV-DNAの検出

EBV産生細胞であるB95-8細胞株（東京医科歯科大学難治疾患研究所保存No. MDH0601）を10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地（日本製薬）で5%CO₂存在下で37℃で1週間継代培養した。培養したB95-8細胞株を遠心して細胞を集め、 1×10^6 細胞/mlになるようにPBSに懸濁し、スライドグラスに10μlのせた後、風乾した。乾燥したスライドグラスをPBSで室温で5分間洗浄し、更に乾燥させた。このスライドグラスを4%ホルマリン/0.1M磷酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）〔以下、0.1M磷酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）をNaPBと称す〕に室温で5分間漬けた。0.1M-NaPBで室温で各3分間、3回洗浄し、2×SSC（pH7.0）に室温で5分間浸漬し、RNase（宝酒造）2mgを溶解したPBS1mlを細胞上に広げ、湿箱中で37℃で1時間放置し、0.1M-NaPBで室温で3分間洗浄し、4%ホルマリン/NaPBに室温で5分間漬けた。次に、0.1M-NaPBで室温で各3分間、3回洗浄し、0.2N-HClに室温で5分間漬けた後に、0.1M-NaPBで3分間洗浄した。次に、70%、90%、及び100%エタノールに室温で各3分間浸漬して脱水し、クロロホルムに室温で10分間浸漬した。最後に、100%エタノールに室温で3分間づつ2回浸漬し、風乾した。乾燥した細胞を0.07N-NaOHに2分間浸漬し、最後に、0.1M-NaPBで室温で3分間洗浄した。

【0039】10%デキストラン硫酸ナトリウム塩、30%ホルムアミド、0.025%鮭精子DNA、及び1×デンハルト溶液を含む2×SSC100μlに、実施例2で調製したAP標識プローブ（プローブA'又はプローブB'）2pモルを溶解してスライドグラス上に広

げ、湿箱中で37℃で約16時間静置した。次に、2×SSCで室温で10分間洗浄し、0.1mM-ZnCl₂を含む1×SSCで45℃で1.5～2時間静置した。30分毎に新鮮な洗浄液に交換した。0.1mM-ZnCl₂を含む1×SSCで室温で10分間浸漬した後、0.1mM-ZnCl₂と10mM-MgCl₂とを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液（pH9.5）（以下、AP緩衝液と称す）に3分間浸漬した。

【0040】AP緩衝液1mlにNTB溶液4μl及びBCIP溶液4μlを加えて混合し、その混合溶液約200μlを前記のスライドグラス上に広げ、湿箱中で25℃～30℃で約24時間反応させた。発色は10mM-EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5）で5分間処理して停止し、10mM-EDTA、10mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5）を含む90%グリセロール溶液で封入して顕微鏡で観察した。これらの結果を図4に示す。B95-8細胞株はEBV-DNAを含んでおり、プローブA'あるいはプローブB'のどちらを使用してもEBV-DNAが検出されることが示された。

【0041】

【発明の効果】本発明方法によれば、EBV-DNAに特異的なプライマーやプローブを用いるので、EBVの迅速かつ正確な測定が可能である。

【0042】

【配列表】

【0043】配列番号：1

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列：

GTGCAGTAAC AGGTAATCTC TGGTA

【0044】配列番号：2

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列：

ATAGCAGCAG CGCAGCCAAC CATAG

【0045】配列番号：3

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列：

CAAGAACCCA GACGAGTCCG TAGAA

【0046】配列番号：4

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列：

AAGAAGCATG TATACTAAGC CTCCT

【0047】配列番号：5

15

配列の長さ: 25
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列:
 CTACGCTGCC CTAGAGGTTT TGCTA
 【0048】配列番号: 6
 配列の長さ: 25
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列:
 ATGCGGACCA CCAGCTGGTA CTTGA
 【0049】配列番号: 7
 配列の長さ: 23
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列:
 TTATGAGTGA CTGGACTGGA GGA
 【0050】配列番号: 8
 配列の長さ: 22
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列:
 GTTAGATCTT ACCAAGTAAG CA
 【0051】配列番号: 9
 配列の長さ: 40
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列:
 AAAGTCCTCC AGAGCTCTAA AGTGTGAGAT TTCGGGTCCA
 【0052】配列番号: 10
 配列の長さ: 40
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列:
 GAGGTCAGGT TACTTACCCC TGAAGGTGAA CCGCTTACCA
 【0053】配列番号: 11
 配列の長さ: 40
 配列の型: 核酸

(9)

特開平5-309000

16

鎖の数: 一本鎖
 配列:
 AGCAGAGTCT GGGAAGACAA CCACAGACAC CGTCCTCACC
 【0054】配列番号: 12
 配列の長さ: 40
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 配列:
 AATTCCAAGG AACAATGCCT GTCCGTGCAA ATTCCAGAGA

10 【図面の簡単な説明】

【図1】PCR法によるEBV-DNAの検出感度を調べた電気泳動及びそのサザンブロットハイブリッドの結果を示す図面に代わる写真である。レーン1はEBV-DNA 5 pg、レーン2はEBV-DNA 0.5 pg、レーン3はEBV-DNA 0.05 pg、レーン4はEBV-DNA 0.005 pg、レーン5はEBV-DNA 0.0005 pg、レーン6はEBV-DNA 0.00005 pg、MはPHYDNA分子量マーカである。

20 【図2】EBV及びその他のウイルスのDNAを用いてプライマーの特異性を調べた電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。レーン1はEBV-DNA、レーン2はHSV-I-DNA、レーン3はHSV-II-DNA、レーン4はHCMV-DNA、レーン5はVZV-DNA、レーン6はHHV-6-DNA、MはPHYDNA分子量マーカである。

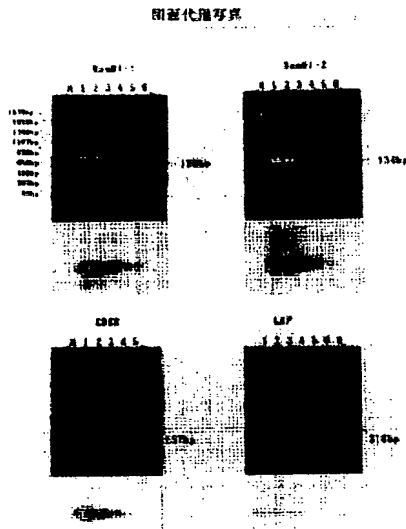
30 【図3】EBV非感染細胞株及びEBV感染細胞株のDNAを用いてプライマーの特異性を調べた電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。レーン1はBJAB細胞株、レーン2はMolt 4細胞株、レーン3はRaji細胞株、レーン4はB95-8細胞株、レーン5はP3HR-1細胞株、レーン6はAKATA細胞株、MはPHYDNA分子量マーカである。

【図4】プローブA'及びB'でEBV-DNAを検出した結果を示す図面に代わる写真である。(A)はプローブA'、(B)はプローブB'を用いたin situハイブリダイゼーションによるB95-8細胞株中のEBV-DNAの検出である。

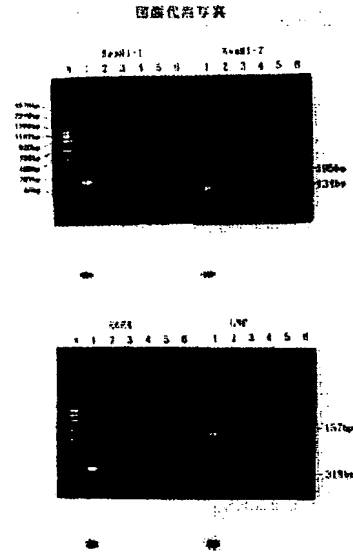
(10)

特開平5-309000

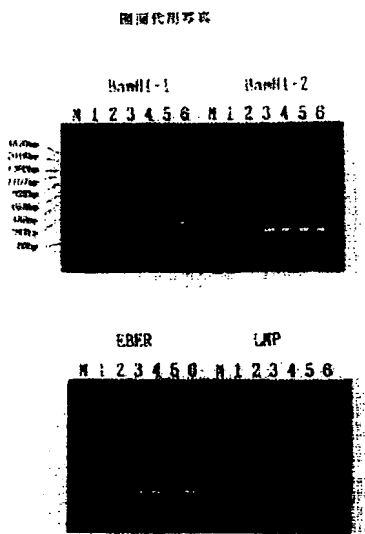
【図1】



【図2】



【図3】



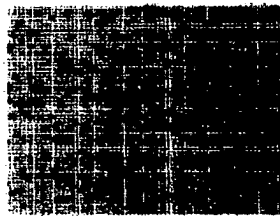
(11)

特開平5-309000

【図4】

断面代用写真

(A) プローブA



(B) プローブB

